

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/53</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/01764</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 14. Januar 1999 (14.01.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01902 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. Juli 1998 (03.07.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 28 737.9 4. Juli 1997 (04.07.97) DE <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> VAN GROENINGHEN, Johannes, Christianus [NL/DE]; Bergweg 35, D-58313 Herdecke (DE). <b>(74) Anwälte:</b> VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR RECOGNIZING AND DETERMINING GNRH RECEPTORS AND THE USE OF GNRH AGONISTS AND GNRH ANTAGONISTS AND OTHER GNRH RECEPTOR LIGANDS FOR THE TREATMENT WITH GNRH RECEPTORS OF TUMOURS ORIGINATING IN THE BRAIN AND/OR NERVOUS SYSTEM AND/OR MENINGES AND/OR OF KAPOSI SARCOMA  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR ERKENNUNG UND BESTIMMUNG VON GnRH-REZEPTOREN UND DIE VERWENDUNG VON GnRH-AGONISTEN UND GnRH-ANTAGONISTEN UND ANDERE GnRH REZEPTOR-LIGANDEN ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN MIT GnRH-REZEPTOREN, AUSGEHEND VOM HIRN UND/ODER NERVEN-SYSTEM UND/ODER DEN HIRNHÄUTEN UND/ODER VOM KAPOSI-SARKOM  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for recognizing and determining GnRH receptors on abnormal cells of a tumour originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or on Kaposi sarcoma. The invention also relates to the preparation of diagnostic kits for tumours originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or for Kaposi sarcoma. The invention further relates to the use of GnRH agonists and GnRH antagonists and/or other ligands for GnRH receptors for producing medicinal drugs for the treatment of tumours originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or for the treatment of Kaposi sarcoma.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder auf das Kaposi-Sarkom. Ferner betrifft die Erfindung die Bereitstellung eines Diagnostik-Kits für Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder für das Kaposi-Sarkom. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten und/oder anderer Liganden für GnRH-Rezeptoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder der Hirnhäuten und/oder zur Behandlung von Kaposi-Sarkom.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**VERFAHREN ZUR ERKENNUNG UND BESTIMMUNG VON GNRH-  
5 REZEPTOREN UND DIE VERWENDUNG VON GNRH-AGONISTEN UND GNRH-  
ANTAGONISTEN UND ANDERE GNRH-REZEPTOR-LIGANDEN ZUR  
BEHANDLUNG VON TUMOREN MIT GNRH-REZEPTOREN, AUSGEHEND VOM  
HIRN UND/ODER NERVENSYSTEM UND/ODER DEN HIRNHÄUTEN UND/ODER  
10 VOM KAPOSI-SARKOM**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Tumor-Diagnose und -Therapie. Insbesondere bezieht sie sich auf die Diagnose und Therapie von Tumoren, welche GnRH-Rezeptoren tragen. Der GnRH-Rezeptor ist ein wohlbekannter Zielpunkt in der Tumor-Therapie.

15 Die postoperative Behandlung von Prostata- und Mammakarzinomen mit Agonisten des Gonadotrophin-freisetzenden Hormons (GnRH; in der Literatur gleichgesetzt mit luteinisierendem Hormon-freisetzendem Hormon; LH-RH) ist eine Standardbehandlung; vgl. Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92; Emons und Schally, 1994, *Human*  
20 *Reproduction Update* 9, Nr. 7, 1364-1379.

So ist bei verschiedenen Steroidhormon-(Sexualhormon)-abhängigen malignen Tumoren, wie Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom, und Endometriumkarzinom in klinischen Studien ein Doppeleffekt bei der Behandlung mit GnRH-Agonisten festgestellt  
25 worden:

- 1) eine indirekte anti-proliferative Wirkung durch Entkoppeln der endokrinen (östrogenen oder androgenen) positiven Beeinflussung des Wachstums des Tumors,
- 2) eine direkt anti-proliferative Wirkung durch einen unbekannten Mechanismus über GnRH-Rezeptoren im Tumorgewebe selbst; vgl. Emons und Schally, 1994, *Human*  
30 *Reproduction Update* 9, 1364-1379.

Die vorgenannte indirekte Wirkung aufgrund einer Steroidhormonabhängigkeit ist seit Jahrzehnten für das Prostatakarzinom und Mammakarzinom bekannt; vgl. Gonzalez-Barcena et

al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92; Jonat et al., 1995, *European Journal of Cancer* 31A, 137-142.

Die direkte anti-proliferative Wirkung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten auf z.B. Prostatakarzinome, Mammakarzinome und Ovarialkarzinome wurde in klinischen Studien bestätigt. Einige für diese Behandlung eingesetzte GnRH-Agonisten, die eine direkte anti-proliferative Wirkung besitzen, sind unter den folgenden Handelsnamen der in Deutschland zugelassenen Arzneimittel bekannt: z.B. Zoladex<sup>®</sup>, Zoladex 10,8<sup>®</sup>, Zoladex Gyn<sup>®</sup>, Profact<sup>®</sup>-Depot, Profact pro injectione /-nasal, Synarela<sup>®</sup>, Enantone Monats-Depot<sup>®</sup>, Uno-Enantone<sup>®</sup>, Enantone-Gyn Monats-Depot<sup>®</sup>, Trenantone<sup>®</sup>, Suprecur<sup>®</sup>, Carcinil<sup>®</sup> oder Decapeptyl<sup>®</sup> 0,5 mg/0,1 mg, Decapeptyl<sup>®</sup> Depot, Decapeptyl<sup>®</sup>Gyn und Decapeptyl<sup>®</sup> Diagnostik. Ein Beispiel eines in mehreren klinischen Studien erforschten GnRH-Antagonisten ist Cetrorelix<sup>®</sup>, das in Deutschland noch nicht als Arzneimittel zugelassen ist. Eine Cetrorelix<sup>®</sup>-Behandlung hat den Nachteil, daß kein Depotpräparat mit z.B. wochenlanger Wirkung existiert. Andere Beispiele von experimentell verwendeten GnRH-Antagonisten sind Antarelix<sup>®</sup> und Antide<sup>®</sup>, wobei für Antide<sup>®</sup> als Ausführungsform auch eine orale Darreichungsform besteht (*Russel-Jones et al., 1995, Bioconjugate Chem.* 6, 34-42).

Forschung in Zellkultur zeigte, daß auf humanen primären Leberzellkarzinomen und Pancreasadenokarzinomen GnRH-Rezeptoren vorkommen. Ferner wurde ein Anfang einer biochemischen Metabolisierung im Sinne einer Spaltung von GnRH zwischen Tyrosin 5 und Glycin 6 in Ratten-Glioma und Ratten-Neuroblastoma beschrieben; vgl. Tao et al., 1991, *Neuropeptides* 20, 125-131. Die Ligand Bindung von GnRH am GnRH-Rezeptor und dessen Signalübermittlung findet jedoch auf andere Weise statt, nämlich an der 8. GnRH-Aminosäure Arginin, und ausschließlich im Falle einer intakten Konformation des GnRH Moleküls und seiner Aminosäure-Seitenketten (Naor, Z., Schacham, Sh., Harris, D., Seger, R., and Reiss, N., 1995, Signal Transduction of the Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Receptor: Cross-Talk of Calcium, Protein Kinase C (PKC), and Arachnoidonic Acid. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 15, 527-545). In der normalen Ratte Adenohypophyse, wo GnRH-Rezeptoren sind, verursacht GnRH eine erhöhte cAMP Produktion, aber unklar ist noch, ob dies ein direkter oder indirekter Effekt (parakrine Interaktion) ist. Bei der Funktion des GnRH-Rezeptors in der Ratte, welche eine Sezernierung von LH und eine erhöhte Produktion von

LH, stimuliert durch GnRH, beinhaltet, spielt die biochemische Metabolisierung von GnRH, z.B. mittels cAMP, lediglich eine indirekte Rolle (Abdilnour, G. und Bourne, G.A., 1995, Adenosine 3',5'-cyclic mono-phosphate and the self-priming effect of gonadotrophin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 107, 1-7). Selbstverständlich wurden auf humanen Gonadotropin produzierenden Hypophysenadenomen GnRH-Rezeptoren festgestellt (Alexander, J.P. und Klibanski, A. Gonadotropin-releasing Hormone Receptor mRNA Expression by Human Pituitary Tumors *In Vitro*, 1994, *Journal of Clinical Investigation*, 93, 2332-2339). Für die Behandlung der Indikation Pubertas Praecox, z.B. entstanden durch das GnRH produzierende hypothalamische Hamartoma, wurden GnRH-Agonisten zur Symptombehandlung für die Blockierung der Gonadotropin produzierenden Zellen in der Adenohypophyse auch bei Kindern eingesetzt (Mahachoklertwattana, P., Kaplan, S.L., Grumbach, M.M. The Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone-Secreting Hypothalamic Hamartoma Is a Congenital Malformation: Natural History, 1993, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77, 118-125).

Für Glioma und andere maligne Tumoren ektodermalen Ursprungs, wie z.B. das maligne Melanom, insbesondere im Falle diffus wachsender Tumore im Nervensystem oder im Falle von Metastasierung (die Bildung von Absiedlungen, z.B. in anderen Organen), ist die Lebenserwartung nicht optimistisch. Dasselbe gilt für das Kaposi-Sarkom. Glioma werden die von der Neuroglia ausgehenden, d.h. vom Ektoderm abgeleiteten Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems, vor allem im Gehirn lokalisierten echten Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) genannt. Diese Glioma treten in unterschiedlicher Differenzierung auf. Unterarten der Glioma sind das Spongioblastom, Oligodendrogliom, Astrozytom, Glioblastom und Retinoblastom. Vor allem der Hirntumortyp des Glioblastoma multiforme (GBM) zeichnet sich durch ein sehr schnelles Wachstum und seine extrem hohe Rezidivrate (d.h. Prozentsatz von Patienten mit Hirntumorrückkehr nach operativer makroskopischer Entfernung) aus.

Sowohl das im ZNS auftretende maligne Melanom, primär oder als Metastase, als auch das primär in der Haut auftretende maligne Melanom und/oder das weiter in der Haut und/oder in anderen Körperorganen sich absiedelnde (metastasierende) maligne Melanom gehören zu den Tumoren, die vom Nervensystem ausgehen; vgl. Shamamian et al., 1994, *Cancer Immunol. Immunother.* 39, 73-83; Florenes et al., 1994, *Cancer Research* 54, 354-356. Maligne Melanome stammen aus dem Neuroektoderm, einer embryonalen Anlageschicht. Burg et al.,

1997, *Deutsches Ärzteblatt* 94, 890-895, beschreiben einen tumorwachstumshemmenden Effekt von Tamoxifen für das maligne Melanom. Ferner besitzen Glioblastoma und malignes Melanom gemeinsam verschiedene Tumormarker; vgl. Shamamian et al., 1994, *Cancer Immunol. Immunother.* 39, 73-83; Florenes et al., 1994, *Cancer Research* 54, 354-356. Die  
5 Prognose ist im Fall einer Metastasierung sehr schlecht; vgl. Burg et al., 1997, *Deutsches Ärzteblatt* 94, 890-895.

Zu den Tumoren, die vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten ausgehen, zählen ferner das Neuroblastom und das Medulloblastom, in ihrer Gesamtheit klassifiziert unter  
10 den sogenannten primitiven neuroektodermalen Tumoren, abgekürzt PNET. Weiter gehören zu diesen Tumoren das Pinealom, ausgehend vom Pinealis(Zirbeldrüsen)-Parenchym und/oder von primordialen Keimzellen im Pinealisbereich oder in der Hirnmittellinie. Ferner ist bei der Zirbeldrüse der Ursprung für das Craniopharyngeom (ein  $\beta$ -HCG bzw. LH-ähnliches Glycoprotein produzierender Tumor; vgl. Tachibana et al., 1994, *J. of Neurosurgery* 80, 79-84)  
15 gelegen, das zu den ektodermalen Tumoren gerechnet wird und von der Vorder-/Oberseite der Hypophyse ausgeht.

Sowohl für das Craniopharyngeom als auch das Meningeom, das als ein gutartiger Tumor ausgehend von Arachnoidaldeckzellen angesehen wird und oft fest an der Innenseite der  
20 Hirnhaut (Dura mater) haftet, wurden Progesteron- und Östrogen-Rezeptoren beschrieben. Ferner wurden Androgen-Rezeptoren für das Meningeom nachgewiesen. In klinischen Studien mit Anti-Progesteron-Arzneimitteln wurden tumorschrumpfende Effekte nachgewiesen.

Die bisherige Erprobung weiterer Therapien (verschiedene Chemotherapieformen,  
25 Strahlentherapie, etc.) hat in zahlreichen klinischen Studien keine wesentliche Verbesserung der Prognose für Tumore, die vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten ausgehen, erbracht. Zur Zeit besteht die Standardtherapie beim Glioblastoma multiforme nach wie vor aus einer möglichst vollständigen operativen Tumorentfernung und einer anschließenden konventionellen Strahlentherapie. Unter dieser Standardtherapie liegt die  
30 statistisch angegebene mittlere Überlebenszeit bei 9-13 Monaten, wobei interindividuelle Schwankungen und insbesondere eine etwas bessere Prognose bei jüngeren Patienten beobachtet wurden.

Ungefähr 30% der Patienten mit rezidivem Glioblastoma multiforme zeigten eine gleichbleibende Größe bzw. ein Schrumpfen des nicht mehr operablen Rest-Hirntumors unter andauernder hoher Dosierung mit Tamoxifen<sup>®</sup>, einem Anti-Östrogen-Präparat. Dieser tumorhemmende Effekt wird bei der Glioblastoma-Behandlung nicht auf seine anti-östrogene Wirkung, sondern auf seine Hemmung der Proteinkinase-C (einem intrazellulären Signalüberträger) zurückgeführt; vgl. Puchner et al., Zentralblatt für Neurochirurgie, Supplement 1996, 47. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie, Seite 44; Pollack et al., 1995, The Efficacy of Tamoxifen as an anti-proliferative Agent *in vitro* for Benign and Malignant Pediatric Glial Tumors, *Pediatr. Neurosurgery*, 22, 281-288). Ferner soll Tamoxifen<sup>®</sup> die Empfindlichkeit der Tumorzellen sowohl für platinhaltige Chemotherapeutika als auch für die Strahlentherapie erhöhen.

Für Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV Astrozytoma) und für Glioma niedrigen Malignitätsgrades (WHO Grad II-IV Astrozytoma) sind Steroidhormon-Rezeptoren in einem geringen Prozentsatz der Fälle festgestellt worden (vgl. Paoletti et al., 1990, *J. Neurosurgery*, Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors, 73, 736-742). Eine indirekte anti-proliferative Wirkung bei Glioblastoma multiforme und Glioma Grad II-IV wurde bis jetzt lediglich in etwa 30% der Fälle in klinischen Studien durch Reagieren des Tumors auf Tamoxifen<sup>®</sup> (ein Anti-Östrogen-Präparat) festgestellt.

Obwohl einige relativ günstige neue Entwicklungen in der Therapie von Glioblastoma multiforme in jüngster Zeit beschrieben wurden, bleibt eine schlechte Prognose *quod vitam* für Patienten mit Glioblastoma multiforme aufgrund der extrem hohen Rezidivrate trotz bisher erprobter Therapieformen und des Mangels an einer spezifischen gezielten Therapie und Frühdiagnostik weiter bestehen.

Der Erfindung liegt einerseits die Aufgabe zugrunde, Diagnostika bereitzustellen, die Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder Kaposi-Sarkom bereits im Frühstadium erkennen und andererseits die Aufgabe, ein Arzneimittel für die Therapie dieser Tumoren bereitzustellen, das zu einer für alle Patienten besseren Prognose führt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder von Kaposi-Sarkom. Ferner betrifft die Erfindung die Bereitstellung eines  
5 Diagnostik-Kits für Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder von Kaposi-Sarkom. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten und von anderen Liganden für GnRH-Rezeptoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder von Kaposi-Sarkom.

10

Die direkte anti-proliferative Wirkung von GnRH-Agonisten auf hirneigenen Tumoren, z.B. Glioblastoma Multiforme, wurde noch nicht beschrieben. Weiterhin war bisher nicht bekannt, daß GnRH-Rezeptoren auf humanen ektodermalen Tumoren, wie z.B. Glioblastoma Multiforme, vorkommen. Auch war bisher nicht bekannt, daß GnRH-Rezeptoren auf Kaposi-  
15 Sarkom vorkommen.

15

Die vorliegende Erfindung liefert einen Beitrag zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder vom Nervensystem und/oder von den Hirnhäuten und/oder vom Kaposi-Sarkom, indem ein geeigneter Zielpunkt für die Diagnose und Therapie  
20 bereitgestellt wird.

20

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Diagnostik-Kits zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren zur immunhistologischen Diagnostik, und/oder zum Nachweis von GnRH-Rezeptor mRNA, zur Therapieüberwachung, zur Nachsorge zur Rezidivfrüherkennung  
25 während der Nachuntersuchung des immer vorhandenen Residualtumors nach einer Operation z.B. eines Gliomas niedrigen Grades (G II-III WHO; vgl. World Health Organization (WHO) Klassifikation der Tumoren des Zentral- und Periphernervensystems, in: Kleihues et al., 1993, Histological Typing of Tumors of the Zentral Nervous System, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo), oder um eine Malignisierung im Sinne eines Glioblastoma multiforme (G IV) festzustellen, und zur Früherkennung in Risikogruppen für eine  
30 Durchmusterung auf das Vorkommen von Tumoren z.B. von Glioblastoma multiforme ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten.

30



Der erfindungsgemäße Kit kann zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren auf Zellmembranen oder in Körperflüssigkeiten z.B. Blut, Plasma, Serum, Urin oder Hirnwasser, Gewebeeextrakten, Gewebeflüssigkeiten, *in vitro*-Zellkulturüberständen und Zell-Lysaten verwendet werden. Der GnRH-Rezeptor kann z.B. immunhistochemisch in z.B. operativ entfernten Tumorpräparaten oder Zellkulturen oder mittels eines üblichen Radio-Immun-Assay in z.B. Körperflüssigkeiten bestimmt werden. Der Diagnostik-Kit umfaßt einen GnRH-Agonisten und/oder einen GnRH-Antagonisten und/oder einen mono- oder polyklonalen Antikörper gegen humane GnRH-Rezeptoren und/oder einen oder mehrere spezifische Primer gegen GnRH-Rezeptoren, z.B. zur Amplifizierung der cDNA eines GnRH-Rezeptors in einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Der Nachweis von GnRH-Rezeptoren wird in an sich bekannter Weise mit bekannten Immunnachweisen, insbesondere mit Enzym-gebundenen Immunoabsorptionsnachweisen (enzym-linked immunoabsorbent assay; ELISA) oder in einer besonderen Ausführungsform mit dem hier nachstehend beschriebenen Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten umfaßt in einer bevorzugten Ausführungsform die folgenden Schritte: a) Homogenisieren von peroperativ gesammeltem Tumorgewebe, b) Abtrennen der Membranfraktion, c) Bestimmen der Proteinkonzentration in der Membranfraktion von b), d) Bestimmen der GnRH-Rezeptorkonzentration in der Membranfraktion von b). Besonders vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren für Gewebe, das von einem Glioblastoma multiforme, Medulloblastom, Pinealom, Neuroblastom, Craniopharyngeom, Meningeom, Chordom, Ewing Sarkom, malignem Melanom oder Kaposi-Sarkom ausgeht. Dieses Verfahren ermöglicht die Diagnose von Tumoren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird frisches, humanes Tumorgewebe z.B. während einer Hirntumoroperation (peroperativ) gesammelt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die GnRH-Rezeptorbestimmung werden die gefrorenen Gewebeproben zerkleinert und homogenisiert. In einem Zentrifugationsschritt werden die Proben von größeren Gewebetrümmern getrennt. Der Überstand wird erneut zentrifugiert. Das

erhaltene Sediment (Pellet) enthält die Membranfraktion, die erneut homogenisiert wird, um eine möglichst homogene Membransuspension zu erhalten. Die Membransuspension wird zur GnRH-Rezeptorbestimmung im Radio-Rezeptor-Assay eingesetzt. Zuvor wird in üblicher Weise, z.B. unter Verwendung des Bio-Rad-Protein-Assay (Bio-Rad, München), die Proteinkonzentration in der präparierten Membranfraktion in bekannter Weise photometrisch bestimmt. Die Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration erfolgt unter Verwendung eines bekannten GnRH-Agonisten, wie z.B. Buserelin®, der spezifisch an GnRH-Rezeptoren in der präparierten Membranfraktion bindet. Da der GnRH-Agonist radioaktiv markiert ist, z.B. mit <sup>125</sup>J, gibt die Konzentration des gebundenen radioaktiv markierten GnRH-Agonisten die Konzentration der GnRH-Rezeptoren in der Membranfraktion wider. Die Konzentration des gebundenen radioaktiv markierten GnRH-Agonisten wird anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute bestimmt. Es werden somit sowohl die Low Affinity/High Capacity als auch die High Affinity/Low Capacity GnRH Rezeptor Bindungsstellen bestimmt (vgl. BAUMANN, K. et al., 1993, Breast Cancer Research Treatment, Vol. 25, Seite 37-46).

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Tumors, ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Glioblastoma multiforme, Medulloblastoms, Pinealoms, Neuroblastoms, Craniopharyngeoms, Meningeoms, Chordoms, Ewing sarkoms, malignen Melanoms oder Kaposi-Sarkoms. GnRH-Rezeptoren als auch eine GnRH-Agonist/Antagonist-Behandlung sind bisher weder für das Craniopharyngeom noch für das Meningeom, noch für das Chordom, noch für das Ewing Sarkom, noch für das maligne Melanom und auch nicht für das Kaposi-Sarkom beschrieben worden. Eine Blut-Hirn-Schranke ist bei diesen Tumoren nicht vorhanden, da sie vom Ursprung extracerebrale intrakranielle oder periphere Tumore sind. Daher ist die erfindungsgemäße Therapie mit GnRH-Agonisten und/oder GnRH-Antagonisten bzw. deren Konjugaten vorteilhaft. Die Blut-Hirn-Schranke ist jedoch für GnRH durchgängig, da ein Zwei-Richtungen-System, ein bidirektioneller aktiver Transport von GnRH durch die Blut-Hirn-Schranke besteht (Barrera, C; Banks, W.A., Fasold, M.B. and Kastin, A.J., 1991, Effects of Various Reproductive Hormones on the Penetration of LHRH Across the Blood-Brain Barrier, Pharmacology, Biochemistry & Behaviour, Vol. 41, 255-257). Daher ist die Behandlung mit GnRH-Agonisten/GnRH-Antagonisten vorteilhaft gegenüber der Behandlung

mit Tamoxifen, für das eine Blut-Hirn-Schranke besteht. Für das Ewing sarkom oder für andere periphere Formen von PNET außerhalb des Zentral Nervensystems, für das maligne Melanom und für das Kaposi-Sarkom spielt die Blut-Hirn-Schranke in der Regel keine wesentliche Rolle bei der Behandlung mit GnRH-Agonisten/Antagonisten, da diese Tumoren meistens außerhalb der Blut-Hirn-Schranke entstehen und bleiben.

Tabelle I:

Liste von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten, welche zur Behandlung eines Tumors mit GnRH-Rezeptoren, ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder Hirnhäuten und/oder vom Kaposi-Sarkom eingesetzt werden können:

<u>GnRH-Agonisten:</u>	<u>GnRH-Antagonisten:</u>
<u>Pharmakologische Stoffname:</u>	<u>Handelsname:</u>
Leuprorelinacetat, Leuprorelin	Cetrorelix <sup>®</sup> , Asta Medica AG, Frankfurt/Main
Triptorelinacetat, Triptorelin	Antarelix <sup>®</sup> , Asta Medica AG, Frankfurt/Main
Buserelinacetat, Buserelin	Antide <sup>®</sup> , Ares Saroni Int. SA, Lausanne, Schweiz
Goserelinacetat, Goserelin	Ramorelix <sup>®</sup> , Behringwerke, Marburg, Deutschland

Weitere Beispiele von GnRH-Antagonisten sind:

- LHRH Antagonisten ähnlich wie Antide<sup>®</sup>, beschrieben in US-Patent 5,480,969  
(Bowers et al. , Date of Patent Jan. 2, 1996)
- LHRH Peptide Derivaten, beschrieben in UK-Patent GB 2 246782 B  
(Albert, R. et al., Patent published 16.09.1992)
- LHRH Antagonisten, beschrieben in US-Patent 5,198,533  
(Schally et al., Date of Patent: Mar. 30, 1993)

Die Behandlungsdosierung von den GnRH-Agonisten in obenstehender Liste entspricht minimal der in der Roten Liste<sup>®</sup> für die jeweiligen GnRH-Agonisten angegeben Dosierung für andere Verwendungsindikationen für die subkutane bzw. intramuskuläre Verabreichungsform.

Für die intravenöse Verabreichung von GnRH-Agonisten wird die minimale Tagesdosierung eingesetzt, vgl. z.B. *Klijn et al., 1982, The Lancet, 1213-1216.*

Die Behandlungsdosierung von den GnRH-Antagonisten Cetrorelix<sup>®</sup>, Antarelix<sup>®</sup>, Antide<sup>®</sup> und  
5 Ramorelix<sup>®</sup> für die subkutane und intramuskuläre Verabreichungsform in obenstehender Liste entspricht minimal der Dosierung, welche z.B. in der Literatur beschrieben wurde und eingesetzt wird bei anderen Indikationen, vgl. z.B. für Cetrorelix<sup>®</sup>: Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92.

10 Die Behandlungsdosierung von den GnRH-Agonisten Cetrorelix<sup>®</sup>, Antarelix<sup>®</sup>, Antide<sup>®</sup> und Ramorelix<sup>®</sup> für die intravenöse Verabreichungsform in obenstehender Liste entspricht minimal der Dosierung, welche für anderen Indikationen bei der betreffenden Zulassungsbehörde bekannt ist, oder in der Deutschen Pharmazeutischen Stoffliste oder in der Literatur beschrieben und gegeben wird, z.B. für Antide<sup>®</sup>: Fattinger et al., 1996, *Am. J. Physiol.* 271  
15 (Endocrinol. Metab. 34): E775-E787. Dasselbe gilt auch für die GnRH-Antagonisten beschrieben in US-Patent 5,480,969, UK-Patent GB 2 246782 B und US-Patent 5,198,533.

Der Erfindung nach können GnRH-Agonisten und/oder -Antagonisten in jeder geeigneten Form verwendet werden. Bei Tumoren innerhalb der Blut-Hirn-Schranke wird die direkte  
20 Injektion, z.B. in den Kreislauf, intraarteriell direkt im Nervensystem Kreislauf oder intravenös oder Injektion in den Liquorwegen, oder Applikation örtlich im Tumorbett nach einer Operation, direkt nach makroskopischer Tumorentfernung peroperativ oder mit Ommaya<sup>®</sup> reservoir oder einer anderen Form der subkutanen, ventrikulären Injektion in den Liquorwegen bevorzugt. Es ist möglich, sowohl GnRH-Agonisten als auch GnRH-Antagonisten zu  
25 benutzen, weil beide als Ligand an den GnRH-Rezeptor binden. Ferner sind Liganden, die spezifisch auf den GnRH-Rezeptor zielen, verwendbar, wie vorzugsweise humane oder humanisierte Antikörper. In vielen Fällen ist bevorzugt, sicherzustellen, daß das zielende Agens vornehmlich Tumorzellen erreicht. Deswegen sind bildgebende (Engl. imaging) Verfahren, bei dem Liganden mit Tracern benutzt werden, ein weiterer Aspekt der Erfindung. Wenn der  
30 Ligand vornehmlich im Tumor lokalisiert wird, kann der Ligand gekoppelt werden an ein cytotoxisches Agens, wie z.B. ein Radioisotop, oder an eine andere toxische Substanz, wie Ricin A oder dergleichen. Bevorzugte GnRH-Agonisten sind aufgeführt in der Roten Liste, auf

die hier ausdrücklich Bezug genommen wird (Rote Liste, 1997, Abschnitt 50, Teil 3, Hypothalamushormone, 50038 bis 50056, Herausgeber ROTE LISTE® Service GmbH, Frankfurt/Main. Bevorzugte GnRH-Antagonisten, welche bereits klinisch an Patienten für andere Behandlungen eingesetzt wurden, sind Cetrorelix® und Antarelix® von Asta Medica AG, Frankfurt/Main, Deutschland und Antide® von Ares-Sarono Int. AG, Lausanne, Schweiz.

Die genannten GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten können in Dosierungen, zugelassen für andere Behandlungen, verabreicht werden. Ebenfalls können Dosierungen eingesetzt werden, die während Dosierungsfindungsstudien (Dose Finding Studies) für die Verwendung ähnlicher Stoffe (Substanzen, Medikamente) ermittelt wurden, wie beispielsweise Somatostatinanaloga bei Hypophysenadenom, Glioblastom oder Pankreasadenokarzinom oder für Phase II Studien mit GnRH Analoga (Agonisten oder Antagonisten) bei anderen Indikationen, z.B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom oder Ovarielkarzinom.

In einer besonderen Ausführungsform sind die GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten mit einem Gonadotropin- bzw. LH-Hemmer z.B. Gossypol® (vgl. Flack et al., 1993, J. Endocrinol. Metab. Oral Gossypol in the Treatment of Metastatic Adrenal Cancer., 76, 1019-1024; Poso, H. et al., The Lancet 1980, 885) oder mit Melatonin oder einem Melatonin-Analogen (einem Agonisten oder Antagonisten) konjugiert. (vgl. Lissoni et al., 1996, Increased Survival Time in Brain Glioblastomas by a Radioneuroendocrine Strategy with Radiotherapy plus Melatonin Compared to Radiotherapy Alone., Oncology, 53, 43-46).

Nachstehend folgt ein Beispiel eines bevorzugten Behandlungsprotokolls.

Erstmalig wurde die GnRH-Rezeptor-Konzentration in Zellmembranen von humanen Hirn- oder Nervensystemtumorzellen, d.h. die *in vitro* wirksamen GnRH-Rezeptoren auf der Membran, mittels Radio-Rezeptor-Assay bestimmt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Bioaktivität bzw. spezifisch die aktiven GnRH-Rezeptoren bestimmt. Dazu wird radioaktiv markiertes Buserelin®, ein GnRH-Agonist, als Marker eingesetzt, der spezifisch an GnRH-Rezeptoren bindet. Anhand der radioaktiven Zerfälle des gebundenen Buserelins® läßt sich die GnRH-Rezeptor-Konzentration ermitteln. Dieser Nachweis wird bereits für andere Tumore wie Mammakarzinom und ähnliche eingesetzt. Das erfindungsgemäß verwendete

Verfahren bestimmt die GnRH-Rezeptor-Konzentration auf Zellmembran-Extrakten von frischem humanem Tumorgewebe.

5 Während der peroperativen Entfernung des Tumorgewebes wird einerseits Gewebe für die pathologisch anatomische Begutachtung und andererseits Tumorgewebe für die GnRH-Rezeptorbestimmung gewonnen und verarbeitet, z.B. auf die hier beschriebene Art und Weise. Nach pathologisch anatomischer Begutachtung und Bestätigung der histologischen Diagnose eines Tumors, ausgehend vom Hirn und/oder vom Nervensystem und/oder von den Hirnhäuten und/oder vom Kaposi-Sarkom, kann eine Prognose für einen Therapieerfolg während einer  
10 Behandlung mit GnRH-Agonisten/Antagonisten anhand der vorhandenen GnRH-Rezeptor-Konzentration gegeben werden.

Bei einer Konzentration des GnRH-Rezeptors von mehr als 1000 amol/mg (=1 fmol/mg) Membranprotein wird der Patient als GnRH-Rezeptor positiv diagnostiziert. Das nicht GnRH-Rezeptor positiv sein, ist kein Ausschlußkriterium für die Behandlung, da es für die  
15 Behandlung mit GnRH-Agonisten/Antagonisten keine klinische Ausschlußkriterien gibt. Das GnRH-Rezeptor positiv sein eines Patienten wird beurteilt als prognostisch schnellere Rezidivtendenz als bei GnRH-Rezeptor negativ sein beim Verlauf des Tumorwachstums während klassischer Standardbehandlung, wobei der GnRH-Rezeptor als prognostischer  
20 Tumormarker fungiert. Auch wird das GnRH-Rezeptor positiv sein als besonders vorteilhaft für die Behandlung mit GnRH-Agonisten/Antagonisten beurteilt und gibt das GnRH-Rezeptor positiv oder negativ sein eine prognostische Aussage über den zu erwartenden Therapieerfolg, so daß der GnRH-Rezeptor bei dieser Behandlung ein prognostischer Tumormarker ist. Die GnRH-Agonist/Antagonist-Behandlung wird sofort nach bekannter pathologisch anatomischer  
25 Begutachtung begonnen, z.B. postoperativ im Falle von Schnellschnitt pathologische Diagnostik.

Nach Bestimmung des Vorhandenseins von GnRH-Rezeptoren wird ein geeigneter Ligand (GnRH-Agonist, GnRH-Antagonist oder Konjugate) selektiert und dem Patienten verabreicht,  
30 von dem der Tumor stammt, vorzugsweise nach diagnostischen Bildverfahren. Vgl. MTT Testliteratur: Hunter et al., 1993, Europ. J. Surg. Oncology, 242-249.

Die Behandlung wird fortgesetzt, solange noch keine komplette Remission eingetreten ist. Kriterien zur Beurteilung des Therapieeffektes sind: A. Tumorzvolumen auf MRT-Bildern und/oder auf CAT-Scan-Bildern, B. Rezidivfreies Überleben, C. Gesamtüberleben nach Erstapplikation sowie D. Karnofsky- und Spitzer-Index. Die Dosierungen für die  
5 Verabreichung, die in jeder dem Fachmann bekannten geeigneten Form sein kann, sind vor- und nachstehend in dieser Patentanmeldung beschrieben.

Der genaue Wirkungsmechanismus von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten auf Tumore ist unbekannt. Für die bereits bekannten Tumorarten mit aktiven GnRH-Rezeptoren  
10 wie z. B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Ovarialkarzinom wird in der Literatur ein lokal regulatorisches autokrines-parakrines System vorgeschlagen; vgl. Irmer et al., 1995, *Cancer Research* 55, 817-822. In der Literatur sind für die genannten Tumore anti-proliferative Aktivitäten der GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten beschrieben worden, sowohl *in vitro* (Palyi et al., 1996, *Cancer Detection and Prevention* 20, 146-152; Irmer et al.,  
15 1995, *Cancer Research* 55, 817-822; Pati et al., 1995, *Endocrinology* 136, 75-84) als auch *in vivo* bzw. klinisch; vgl. Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92; Jonat et al., 1995, *European J. of Cancer* 31A, 137-142; Emons und Schally, 1994, *Human Reproduction Update* 9, Nr. 7, 1364-1379. Diese anti-proliferative Aktivität geht dabei über den zu erwartenden anti-proliferativen Effekt der reversiblen "chemischen Kastration" durch GnRH-Agonisten hinaus.  
20

Für Glioblastoma und Glioma kommt in gleicher Weise folgender Wirkungsmechanismus in Betracht. In der Literatur (Constam et al., 1992, *J. Immunology* 148, 1404-1410) wird die Produktion von Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) durch Glioblastoma-Zellen  
25 beschrieben. Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  wird von Melcangi et al., 1995, *Endocrinology* 136, 679-686, als ein Produkt von Ratten-Gliazellen, d.h. normalen Nicht-Tumorzellen, beschrieben, der als Faktor *in vitro* die natürliche GnRH-Produktion in Hypothalamuszellen anregt. Postuliert wird, daß das örtlich (lokal) durch Glioblastoma produzierte und sezernierte GnRH eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum des Tumors hat, was ebenfalls für TGF- $\beta$  bekannt ist. Auch humane Glioblastomazellen bzw. Gliomazellen können zirkulierende  
30 immunsuppressive Substanzen sezernieren, vor allem TGF- $\beta$ , und somit eine Beeinträchtigung zellulärer Immunreaktionen induzieren. Die Zunahme von TGF- $\beta$  hat also wahrscheinlich außer einer GnRH-Produktion-stimulierenden Funktion auch einen immunsuppressiven

(abwehrhemmenden) Effekt auf die zelluläre Immunität des Patienten, wodurch das Tumorwachstum gefördert wird und die Tumorgroße zunimmt. Für Glioblastoma multiforme, Medulloblastom und malignes Melanom wurde dieses immunsuppressive Phänomen von TGF- $\beta$  beschrieben; vgl. Stockhammer et al., 1995, *J. of Neurosurgery* 83, 672-681; Jennings et al., 1994, *Hum. Pathol.* 25, 464-475; Bizik et al., 1996, *J. Cell Biochem.* 62, 113-122; van Belle et al., 1996, *Am. J. Pathol.* 148, 1887-1894. Dieses autokrin-parakrin wachstumsregulierende System läßt sich auch umkehren, was eine Abnahme der Tumorgroße zur Folge hat. Diese Umkehrung (in der Endokrinologie "negatives Feedback" genannt) kann man im Prinzip mittels eines Überschusses an GnRH bewirken (kompetitive Inhibition). Dieser Effekt wird durch GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten an Stelle von GnRH noch verstärkt. Die Folge dieser Therapie ist eine Abnahme der TGF- $\beta$  Produktion und eine daraus folgende Abnahme der Tumorgroße. Auch  $\beta$ -HCG hat eine immunsuppressive Rolle. Durch GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten wird erfindungsgemäß ebenfalls die LH- $\beta$ - bzw.  $\beta$ -HCG-Produktion gehemmt. Auch wird bei GBM die EGF-Produktion gehemmt.

Für die Tumoren, ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten, die zur Indikationserfindung gehören wird verwiesen auf die World Health Organisation (WHO) Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems, die 1990 ausgearbeitet wurde (Kleihues et al., 1993, *Histological Typing of Tumours of the central nervous system*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo). Außer den Tumoren, genannt in obengenannter WHO Klassifikation, gehören noch das maligne Melanom, das Ewing Sarkom und das Kaposi-Sarkom zur Indikationserfindung. Von der Indikationserfindung ausgenommen sind das Hypophysenadenom, alle Metastasen außer Ewing Sarkom, Melanom und Kaposi-Sarkom, Lymphome und hämatopoetische Tumore. Die Keimzelltumoren, wie z.B. das Chorionkarzinom, ähneln den malignen Tumoren der Plazenta, von denen bekannt ist, daß diese GnRH-Rezeptoren haben. Deshalb gehören die Keimzelltumoren des Zentralnervensystems zur vorliegenden Indikationserfindung. Das Kaposi-Sarkom, das multizentrisch im Körper vorkommt, besteht aus Zellen monoklonalen Ursprungs (Rabkin et al., 1996, *The New England Journal of Medicine*, 14, 988-993). Es hat spezifische Antigene gemeinsam mit dem Neurofibrom der Haut, einem Tumor, ausgehend vom Nervensystem (Rudolph, P. et al., 1997, *Am. J. Surg. Pathol. (US)*, 21(7) 791-800 ).



Das Kaposi-Sarkom ähnelt hormonell den malignen Plazentatumoren und dem Meningiom, weil das Kaposi-Sarkom wie diese Tumoren  $\beta$ -HCG Rezeptoren besitzt und wie z.B. das Meningiom auf  $\beta$ -HCG Verabreichung anti-proliferativ reagiert (Boyle-Wash et al., 1995, Effect of glycoprotein and protein hormones on human meningioma cell proliferation *in vitro*, Journal of Endocrinology, 145, 155-161; Albini et al., A., 1997, The beta-core Fragment of human chorionic gonadotropin inhibits growth of Kaposi sarcoma-derived cells and an new immortalized Kaposi sarcoma cell line, AIDS (US), 11 (6), 713-721); Gill et al., 1996, The effects of preparations of human chorionic gonadotropin on aids-related Kaposi Sarcoma, The New England Journal of Medicine, 335 (17), 1261-1269). Aufgrund der Analogie mit Meningioma hat Kaposi-Sarkom GnRH-Rezeptoren. Hierbei spielt der entdeckte autokrine Zusammenhang von GnRH als bekanntlich bei der Plazenta und bei Plazentatumoren,  $\beta$ -HCG freisetzendes Hormon eine Rolle (Lin et al., 1995, J. Clin. Endocrinol. Metab. 80: 580-585). Sowohl die obengenannten Tumoren in der WHO Klassifikation von Zentralnervensystemtumoren als auch das maligne Melanom mit  $\beta$  HCG Produktion und/oder mit  $\beta$ -HCG Rezeptoren haben GnRH-Rezeptoren. Das Ewing Sarkom gehört zu der Gruppe von primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) und ist eine periphere Form hiervon (Grier, H.E., 1997, The Ewing Family of Tumors. Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. Pediatric Clin. North Am. (US), 44 (4), 991-1004).

Die Zirbeldrüse (Glandula pinealis) ist der Ursprung für die Produktion des Hormons Melatonin, ein GnRH-Rezeptor-Expression stimulierendes Hormon beim metastasiertem Prostatakarzinom im Falle von Resistenz während der GnRH-Agonist Behandlung (vgl. Lissoni et. al., 1997, European Urology 31, 178-181) und hat zusätzlich eine anti-angiogenetische Aktivität (Regelson, W., Pierpaoli, W., 1987, Cancer Invest., 5, 379-385). GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten besitzen eine anti-mitotische bzw. anti-proliferative Aktivität durch Hemmung von Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (Motta et al., 1996, J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 56, 107-111, 1996). Epidermal Growth Factor kommt auch als mitogen und somit als positiver Wachstumsfaktor, z.B. in Glioblastoma Multiforme vor (Rao et al., 1996, Peptides (US), 17, 179-181). Ein Melatonin-GnRH-Analog-Konjugat kombiniert somit sinnvoll eine anti-mitotische mit einer anti-angiogenetischen Aktivität auf Tumoren wie z.B. Glioblastoma und induziert die weitere Expression von GnRH-Rezeptoren in z.B. Glioblastoma multiforme, um eine Resistenz gegen GnRH-Agonist/Antagonist-Behandlung durch GnRH-Rezeptor-Depletion zu vermeiden.

Erfindungsgemäß werden erstmalig GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels bereitgestellt, um Tumore, ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder Kaposi-Sarkoma, zu behandeln.

- 5 Die GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten und die konjugierten GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten dienen erfindungsgemäß zur Behandlung von Tumoren, ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten, z.B. eines Glioblastoma multiforme. Die Arzneimittel der Erfindung können in jeder dem Fachmann bekannten Art und Weise hergestellt werden, insbesondere zur subkutanen, intramuskulären, intravenösen, intraspinalen  
10 bzw. subduralen oder intranasalen Applikation oder in Form eines Depot-Implantats. Die Arzneimittel der Erfindung können ebenfalls über ein subkutanes, ventrikuläres Cytostatikareservoir mit Verbindung zum Ventrikel verabreicht werden, wobei man durch die Haut hindurch das Reservoir mit Injektionen auffüllen kann. Die GnRH-Agonisten können in der gleichen Dosierung verabreicht werden, die z.B. für die Behandlung von Prostata-,  
15 Mammacarcinom oder Endometriose eingesetzt werden; vgl. z.B. Rote Liste, 1997, Abschnitt 50, Teil 3, Hypothalamushormone, 50038 bis 50056, Herausgeber ROTE LISTE® Service GmbH, Frankfurt/Main, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird; vgl. Annex A. Die minimale Dosierung entspricht der in der Roten Liste für die jeweiligen GnRH-Agonisten angegebenen Dosis. Bei z.B. der intraspinalen oder subkutanen, ventrikulären Verabreichung  
20 über ein Cytostatikareservoir kann die minimale Dosierung niedriger sein als in der Roten Liste für die jeweiligen GnRH-Agonisten angegeben ist. Die maximale Dosierung entspricht dem LD<sub>50</sub>-Wert für die entsprechenden GnRH-Agonisten. Die Dosierung kann gegebenenfalls nach einem neurologisch erhaltenen Befund der GnRH-Rezeptor-Konzentration erhöht oder erniedrigt werden. Die Häufigkeit der Applikation bzw. die Tagesdosis kann ebenfalls der  
25 Roten Liste entnommen werden. Die Arzneimittel werden vorzugsweise bis zur kompletten Remission (Rückbildung) des Tumors, die neuroradiologisch und klinisch festgestellt werden kann, verabreicht.

- 30 Zur subkutanen Verabreichung können z.B. Carcinil®, Decapeptyl® 0,5 mg/0,1 mg oder Uno-Enantone eingesetzt werden. Als Depot-Implantate können z.B. Profact®-Depot, Zoladex® oder Enantone Monatsdepot verabreicht werden. Zur intramuskulären Verabreichung können z.B. Decapeptyl®-Depot, Decapeptyl®-Gyn oder Enantone-Gyn eingesetzt werden. Zur

intranasalen Verabreichung können z.B. Profact®-Nasal, Suprecur®-Nasal oder Synarela®-Nasal eingesetzt werden. Zur intravenösen Verabreichung bzw. zur intranasalen Verabreichung kann z.B. Profact pro injectione / -nasal in den Dosierungen verabreicht werden, die von Klijn, J.G. und De Jong, F.H. angegeben sind in Klijn, J.G. und De Jong F.H., 1982, *The Lancet*, 1213-1216. Die GnRH-Antagonisten können in der Dosierung verabreicht werden, die z.B. für Cetrolix® in Gonzalez-Barcena et al., 1994, *The Prostate* 24, 84-92, angegeben ist oder minimal in der Dosierung verabreicht werden die z.B. für Antide® angegeben ist in Fattinger et al., 1996, *Am. J. Physiol.* 271 (Endocrinol. Metab. 34): E775-E787).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als beschränkend aufzufassen.

#### Beispiel 1: GnRH-Rezeptor-Konzentrationsbestimmung

Als Beispiel einer GnRH-Rezeptor-Konzentrationsbestimmung auf Zellmembranextrakten von Zelllinien und/oder von Zellkulturen wird der Decapeptyl®-Radio-Rezeptor-Assay mit Membranen durchgeführt (wie beschrieben in Emons, G. et al., 1993, *Cancer Research* 53, 5439-5446). Auf eine humane Zelllinie, wie die humane Glioblastoma-Zelllinie U-87 MG oder U-373MG (Pinski et al., 1994, *Cancer Research* 54, 5895-5901) werden die GnRH-Rezeptoren nach dieser Vorschrift bestimmt. Hierbei werden sowohl die Low Affinity/High Capacity als auch die High Affinity/Low Capacity-GnRH-Rezeptor-Bindungsstellen bestimmt. Es werden ähnliche Resultate erhalten, wie die die bei Emons G. et al., *supra*, für die Zelllinien EFO-21 und EFO-27 beschrieben sind.

Als weiteres Beispiel einer GnRH-Rezeptor-Konzentrationsbestimmung auf Zellmembranextrakten von Zelllinien und/oder Zellkulturen wird der LHRH-Radio-Rezeptor-Assay mit markiertem Triptorelin (Emons G. et al., *supra*) auf einer Kaposi-Sarkoma-Zelllinie, so wie die bekannte Zelllinie KSY-1 oder KS-SLK (Parkash et al., 1996, *New England Journal of Medicine* 335, 17, 1261-1269) und auf eine humane maligne Melanoma-Zelllinie, wie die bekannten Zelllinien MV3 und BLM (Goldbrunner, R.H. et al., 1996, *Anticancer Research* 16 (6B), 3679-3687) durchgeführt mit ähnlichen Resultaten der GnRH-Rezeptorbestimmungen wie beschrieben in Emons, G. et al., *supra*, für die Zelllinien EFO-21 und EFO-27.

Beispiel 2: GnRH-Rezeptor mRNA-Bestimmung mittels RT-PCR

Als Beispiel einer GnRH-Rezeptor messenger RNA Bestimmung mittels RT-PCR wird z.B. RNA aus der Glioblastoma Zelllinie U-87 MG oder U-373MG in einer ersten Reaktion in cDNA umgeschrieben. In einer weiteren Reaktion wird z.B. das 884 bp lange Fragment des hypophysen GnRH-Rezeptors (Kakar, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1992, 289-295) oder z.B. des Plazenta-GnRH-Rezeptors (Leung, P.C.K., Biological Signals 1996, 5, 63-69) oder des Plazenta-GnRH-Rezeptor-Gens (Lin, L. et al., J. Clinical Endocrinol. Metabolism 1995, Bd. 80, Nr. 2, 581-584) mit spezifischen Primern in einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Hierbei dient die cDNA eines bekannten GnRH-Rezeptor positiven Zelllinie als positive Kontrolle. Die Reaktionsprodukte werden dann auf einem Polyacrylamid (PAA)-Gel sichtbar gemacht. Auf dem PAA- Gel sieht man in Spur 1 den Fragmentgrößen-Marker, in Spur 2 eine deutliche Bande des 884bp langen GnRH-Rezeptor PCR Produktes bei der MCF 7 Positivkontrolle und in der Spur der Glioblastoma Zelllinie ebenfalls ein 884bp Produkt Signal oder andere GnRH Rezeptor-Splice-Variant-(Fragment) Signale. Diese mRNA Bestimmung wird ähnlich wie andere GnRH-Rezeptor mRNA Bestimmungen durchgeführt, siehe z.B. Irmer et al., 1995, Cancer Research, 55, 817-822.

Beispiel 3: Therapeutische *in vitro*-StudieProliferations-Assay auf Zellkulturen.

Eine humane Zelllinie wie die bekannte humane Glioblastoma Zelllinien U-87MG oder U-373MG (Pinski et al., *supra*) oder eine humane Zelllinie wie die bekannte Kaposi-Sarkoma Zelllinien KSY-1 oder KS-SLK (Parkash et al., 1996, New England Journal of Medicine, 335, 17, 1261-1269) oder eine humane Zelllinie wie die bekannte humane maligne Melanoma Zelllinie MV 3 oder BLM (Goldbrunner, R.H. et al., 1996, Anticancer Research, 16 (6B), 3679-87) oder eine humane Medulloblastoma Zelllinie wie die bekannte Zelllinie Daoy oder D283 MED (Stockhammer et al., 1995, J. Neurosurgery, 83, 672-681) oder humane Meningioma Zellkulturen (Boyle-Wash, E. et al., 1995, Journal of Endocrinology 145, 155-161) wird in Kultur gebracht, wie von obengenannten Autoren für die obengenannten Zelllinien beschrieben und dann wie beschrieben von Emons, G. et al., 1993, *supra* und Irmer, G. 1995, *supra* behandelt mit den dort angegebenen Konzentrationen von GnRH-Agonist-Triptorelin, GnRH-Antagonist SB-75 (Cetrorelix<sup>®</sup>) oder GnRH-Antagonist Ramorelix<sup>®</sup>. Ähnliche

Resultate wie von Emons et al., Cancer Research 53, 1993, 539-544 und Irmer, G. et al., *supra* beschrieben wurden, erhalten.

Die obengenannten Zelllinien wurden separat davon ebenfalls behandelt mit einem GnRH-Agonisten, entweder Goserelin (Zoladex<sup>®</sup>), Buserelin oder Leuprorelin, oder mit einem GnRH-Antagonisten, wie Antide<sup>®</sup> oder Antarelix<sup>®</sup>. Ähnliche anti-proliferative Effekte wurden beobachtet, wie von Pinski et al. oder Irmer et al., *supra*, beschrieben.

Separat davon werden solche Zelllinien ebenfalls behandelt mit jeweils einem der GnRH-Antagonisten Cetorelix<sup>®</sup>, Antarelix<sup>®</sup>, Antide<sup>®</sup> und Ramorelix<sup>®</sup> oder mit einem GnRH-Antagonisten wie beschrieben in US-Patent 5,480,969, US-Patent 5,198,533 oder UK-Patent GB 2 246782 B und zwar auf ähnliche Weise wie bei Emons et al., *supra*, für SB 75 (Cetorelix<sup>®</sup>) angegeben. Ein ähnlicher anti-proliferativer Effekt tritt auf.

Die obengenannten Zelllinien werden separat davon ebenfalls behandelt mit monoklonalen Antikörpern gegen ein GnRH-Rezeptor Antigen, wie beschrieben von KARANDE, A.A. et al., 1995, Mol. Cell. Endocrinol. 114 (1-2), p. 51-56. Ein ähnlicher anti-proliferative Effekt wird bei den obengenannten Zelllinien beobachtet wie von ACKERMANN, R. C. et al., 1994, Cancer Letters, 81. 177-184 für die Zelllinie OVCAR-3 beschrieben worden ist.

#### Beispiel 4: *In vivo*-Studie im Xenotransplantations-Modell

##### Eine *in vivo*-Studie auf Nacktmäusen

Der Effekt der Behandlung von mit Tumoren implantierten Nacktmäusen (Pinski et al., *supra*) mit jeweils einem der GnRH-Agonisten Buserelin, Triprorelin, Goserelin und Leuprorelin und mit jeweils einem der GnRH-Antagonisten Cetorelix<sup>®</sup> (SB-75), Antarelix<sup>®</sup>, Antide<sup>®</sup> und Ramorelix<sup>®</sup> auf das Wachstum von malignen Gliomen U-87 MG und U-373MG wird von uns nachgewiesen mit Tagesdosierungen und Kontrollen bei Nacktmäusen, wie für den Wirkungsnachweis für ähnliche Peptide beschrieben wurde in Pinski et al., *supra*. Ähnliche wachstumshemmende Effekte konnten bei den genannten Tumoren durch Behandlung mit den von uns hier genannten GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten beobachtet werden.

Beispiel 5: Phase I-Studie

Patienten mit Rezidiv eines nicht rezesierbaren Glioblastoma multiforme bei Zustand nach mikrochirurgischer Resektion und/oder nach externer konventioneller Strahlentherapie und/oder Brachytherapie oder Patienten mit einem diffus intraaxial wachsenden Hirntumor, multifokale Ausdehnung der Geschwulst bzw. Vorliegen einer Gliomatosis Cerebri, ein Tumolvolumen von mehr als 65 ml oder ein minimaler Tumordurchmesser von mehr als 5 cm werden behandelt mit GnRH-Agonist Buserelin in der intravenösen Verwendung wie beschrieben von Klijn, J.G.M. et al., 1982, The Lancet, Mai 19, 12143-1214, und in ebenfalls mit der dort beschriebenen intranasalen Applikation als Dauermedikation. Als Behandlungseffekt tritt eine Tumolvolumenreduzierung auf MRT bzw. CT – Bildern auf. Ein rezidivfreies Überleben, das länger ist, als für die Tamoxifen-Behandlungsmethode von Glioma (Pollack et al., 1995, Pediatr. Neurosurgery 22, 281-288) beschrieben ist, wurde beobachtet.

Beispiel 6: Phase I-Studie

2 Patienten mit inoperablen, stereotaktisch bestätigtem Glioblastoma multiforme werden nach konventionellen Strahlentherapie behandelt mit Zoladex<sup>®</sup> in der Dosierung und Verabreichungsform unter Dauermedikation, welche für das metastasierte Mammakarzinom in der Roten Liste angegeben wird. Auf den MRT Kontrollen zeigt sich eine signifikante Tumolvolumenreduktion.

Beispiel 7: Phase II-Studie

Patienten mit histologisch bestätigtem Glioblastoma multiforme nach einer ersten Operation werden (randomized controlled) behandelt mit Zoladex<sup>®</sup>, wie beschrieben in Jonat et al., 1995, European J. Cancer, 137-142. Nach der Strahlentherapie werden sie unterteilt in 2 Gruppen. Eine Gruppe wird mit Zoladex<sup>®</sup> und eine Gruppe ohne Zoladex<sup>®</sup> (oder mit Cetrorelix<sup>®</sup> und ohne Cetrorelix<sup>®</sup> oder mit Antide<sup>®</sup> und ohne Antide<sup>®</sup> oder mit Decapeptyl<sup>®</sup> oder ohne Decapeptyl<sup>®</sup> usw.) behandelt. Die Effekte sind ähnlich wie beim metastasiertem perimenopausalem Mammakarzinom. Der Prozentsatz mit objektivem signifikanten Therapieeffekt wird beurteilt unter den Kriterien Tumolvolumen, rezidivfreies Überleben,

Gesamtüberleben nach Erstapplikation und Karnofsky- und Spitzer Index bei klinisch neurologischer Untersuchung und unter Berücksichtigung der weiteren Untersuchungskriterien (Sposto, R. et al., 1989, J. Neurooncology, 7, 165-177, und Kirby, S. et al., 1995, J. Natl. Cancer Institute, 87, 1884-1888, 1995). Im MRT und/oder CAT Scan wird eine signifikant größere Tumolvolumenreduzierung bzw. signifikant längeres rezidivfreies Überleben und ein signifikant längeres Gesamtüberleben nach Erstapplikation festgestellt als bei der nicht mit Zoladex® behandelte Kontrollgruppe.

Mit einer dem Fachmann bekannten Methode von Gentherapie werden Retroviren und Antisense-GnRH-Rezeptor-Vektoren stabil transfektiert in Glioma-Zelllinien und es tritt ein anti-proliferativer Effekt auf.

#### Beispiel 8: Die Sammlung von Gliomagewebe

Während Hirntumoroperationen (peroperativ) wurde frisches, humanes Tumorgewebe trocken in einem sterilen Schälchen ohne Zufügung von Medium gesammelt und sofort in ein steriles Standard-Plastikröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde luftdicht verschlossen und nach etwa 15 Minuten in einem Dewar-Gefäß (Union Carbide Cryogenic Equipment 35HC, Serien-Nr. 103-139-T5), das flüssigen Stickstoff enthielt, schockgefroren. Die Gewebeproben wurden etwa 2 Monate in flüssigem Stickstoff bis zur GnRH-Rezeptorbestimmung aufbewahrt.

#### Beispiel 9: Gewebeaufarbeitung

Die gefrorenen Gewebeproben wurden von Blut- und Fettresten befreit und mit einem Skalpell in ca. 2 x 2 x 2 mm große Stücke zerschnitten. Die Gewebeproben wurden 1 Minute bei maximaler Leistung in einem Dismembrator II (B. Braun, Melsungen) homogenisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde in 1000 µl kaltem Puffer 1 (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,4, 4°C) aufgenommen und möglichst homogen durchmischt. In einem ersten Zentrifugationsschritt (800 x g, 10 Minuten, 4°C) wurde die Probe von größeren Gewebetrümmern getrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (10.000 x g, 45 Minuten, 4°C). Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschritts wurde verworfen und das Pellet, das die Membranfraktion enthielt, in 1000 µl kaltem Puffer 1 aufgenommen und mit einem Polytron-Homogenisator dreimal je 4 Sekunden homogenisiert, um eine möglichst

homogene Membransuspension zu erhalten. Zu dieser Membranfraktion wurden 1000 µl kalter Puffer 1 zugesetzt. Diese Suspension wurde zur GnRH-Rezeptorbestimmung im Radio-Rezeptor-Assay eingesetzt.

5 Beispiel 10: Proteinkonzentrationsbestimmung

Das Bio-Rad-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. 3,5 ml dieses Reagenz wurde mit 50 µl der präparierten Membranfraktion gemischt und 10 Minuten inkubiert. Die photometrische Messung der Proteinkonzentration erfolgte als  
10 Zweifachbestimmung bei  $\lambda$  ist gleich 595 nm in bekannter Weise. Als Proteinstandard diente ein Humanalbumin-Proteinstandard, mit dem in entsprechender Weise die Messungen ausgeführt werden.

Beispiel 11: Der Radio-Rezeptor-Assay

15 Die Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration erfolgte in der wie vorstehend beschriebenen präparierten Membranfraktion des Gewebes. Der Radio-Rezeptor-Assay umfaßte zwei verschiedene Probenansätze, die jeweils vierfach bestimmt wurden: (a) Probenansätze mit der präparierten Membranfraktion und (b) Kontrollansätze.

20 a) zu 100 µl Membranfraktion wurden 300 µl Puffer 2 (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,4, 0,1% Rinderserumalbumin) und 100 µl Tracer ( $^{125}\text{J}$ -Buserelin, 80.000 cpm/100µl) zugesetzt.

b) für die Kontrollen wurden 250 µl Puffer 2, 100 µl Tracer, 100 µl Membranfraktion und 50  
25 µl GnRH-Analogon ( $10^{-5}$  M Buserelin) vermischt.

Die einzelnen Proben wurden dann gut durchmischt und anschließend 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Radio-Rezeptor-Assay wurde durch Zugabe von 500 µl Rindergammaglobulinlösung (0,1% Rindergammaglobulin, 0,15 M NaCl) gestoppt. Danach  
30 wurden 1000 µl einer 25% PEG-6000, 0,15 M NaCl-Lösung zugesetzt.

Die Proben wurden nochmals homogen durchmischt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Abtrennung der PEG-Hormon-Rezeptor-Komplexe erfolgte mit einem Zentrifugationsschritt



(1.600 x g, 30 Minuten, 4°C), bei dem die Komplexe aufgrund ihrer höheren Masse das Pellet bilden. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die Anzahl der Zerfälle pro Minute, die als Basis für die Berechnung des GnRH-Rezeptor-Gehalts dient, wurde anschließend mit einem Gamma-Counter (Berthold) gemessen.

5

#### Beispiel 12: Überprüfung des Radio-Rezeptor-Assays

Gewöhnlich wurden mehrere Gewebeproben in einem Versuchsansatz untersucht. Zum Ausschluß eines systematischen Fehlers bei einem negativen Ergebnis aller Proben in einem Assay, wurde bei jedem Assay eine Standardprobe aus Rinder-Hypophysengewebe parallel zu den Tumorgewebeproben untersucht. Der Nachweis von GnRH-Rezeptoren in Rinder-Hypophysengewebe diente somit als Positivkontrolle. Das Hypophysengewebe wurde wie die Tumorgewebeproben aufgearbeitet und die Membranfraktion in der gleichen Weise gereinigt.

10

#### Beispiel 13: Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts

15

Die Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts (fmol/mg Membranprotein) erfolgte aufgrund der Anzahl der Zerfälle pro Minute (cpm), der spezifischen Bindung, der eingesetzten Proteinmenge und der spezifischen Aktivität des radioaktiv markierten Liganden.

20

Die spezifische Bindung ( $B_{\text{spez}}$ ) ergibt sich aus der Differenz des Mittelwerts der Vierfachbestimmung der Gesamtbindung ( $B_0$ ) und des Mittelwerts der Vierfachbestimmung der unspezifischen Bindung (NSB).

25

Die eingesetzte Proteinmenge wird, wie vorstehend bei Ziffer 3 dargestellt, photometrisch bestimmt.

Daten des Analogons  $^{125}\text{J}$ -Buserelin:

MG: 1253 g/mol

30 Spezifische Aktivität: 1470 mCi/mg

Aktivität der  $^{125}\text{J}$ -Buserelin-Lösung: 20  $\mu\text{Ci/ml}$

- 1470 mCi/mg  $^{125}\text{J}$ -Buserelin =  $54,4 \times 10^9$  Bq/mg

- 1 ml  $^{125}\text{J}$ -Buserelin-Lösung beinhalten  $13,61 \times 10^{-9} \text{ g } ^{125}\text{J}$ -Buserelin mit  $7,4 \times 10^6 \text{ Bq}$
- $13,61 \times 10^{-9} \text{ g/ml } ^{125}\text{J}$ -Buserelin =  $10,9 \times 10^{-12} \text{ Mol } ^{125}\text{J}$ -Buserelin.  $54,4 \times 10^9 \text{ Bq} = 44,4 \times 10^7 \text{ cpm}$
- $10,90 \times 10^{-12} \text{ Mol } ^{125}\text{J}$ -Buserelin =  $44,4 \times 10^7 \text{ cpm}$
- 5 - 1000 cpm entsprechen  $0,247 \times 10^{-15} \text{ Mol } ^{125}\text{J}$ -Buserelin

Zur Berechnung der GnRH-Rezeptorkonzentration (fmol/mg Membranprotein) aus den gemessenen cpm-Werten, muß nun noch die eingesetzte Proteinmenge und der Zerfallsfaktor berücksichtigt werden. Die Formel zur Berechnung des GnRH-Rezeptorgehalts lautet somit:

10

$$\frac{0,247 \times 10^{-15} \text{ Mol } ^{125}\text{J}\text{-Buserelin}}{\text{Zerfallsfaktor} \times \text{Proteinmenge}} = 1000 \text{ cpm}$$

15

Tabelle II:Bestimmung der GnRH-Rezeptorkonzentration

5

Aufgeführt sind Ergebnisse der GnRH-Rezeptor-Bestimmung mit dem erfindungsgemäßen Radio-Rezeptor-Assay von Gewebeproben verschiedener Patienten.

Histologieproben	ER fmol/mg/Prot	PgR fmol/mg/Prot	GnRH-Rez atomol/mg/Prot	Befund
	10	20	1000	negativ
	10-20	20-30	1000-3000	schwach positiv
	20	30	3000-5000	positiv
	50	100	5000	stark positiv
Chordom	1	1	708	
GBM	1	2	2478	
GBM	1	1	895	
GBM	1	1	1111	
Gliom G II	1	1	3635	
Meningeom	1	74	1	
Adenocarcinom	1	1	1	
GBM	1	1	7357	
Fibrillär				
Astrozytom G II	1	1	1	
Meningeom	1	177	7444	
Meningeom	1	550	1588	
GBM	1	1	4466	

10 ER=Östrogen-Rezeptor, PgR=Progesteron-Rezeptor, GnRH-Rez=GnRH-Rezeptor

zusätzliche Werte:

	-Chordom	1	1	1117	schwach positiv
	-Meningiom intraspinal	3	7	1640	schwach positiv
5	-Hirn Metastase eines	1	1	200	negativ
	Platteneptithelzell				
	karzinoms der Lunge				
	-Normales Hirngewebe	4	1	460	negativ

10

Beispiel 14: Proliferations assay mit der humanen maligne Melanoma Zelllinie MV3

Die humane Melanoma Zelllinie MV3 wurde in Kultur gebracht (in Lanzzeitkultur in RPMI Medium (Gibbco Co.) mit 1% Penstrep und 10% heat inactivated Fetal Calf Serum). Der Proliferationsassay wurde durchgeführt mit  $6 \times 10^2$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten. Die Zellen wurden zuerst von der Kulturflasche mit einer 0,02 mM Lösung abgelöst und dann gewaschen mit PBS-Standardlösung. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten (1200 g) wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Dazu nahm man 1 Aliquot von 20 microl der Zellen, welches mit Trypanblau verdünnt wurde in einer 1 zu 20 Verdünnung. Das Trypanblau färbt die nekrotischen Zellen an. Dann erfolgte die Zählung in der Neubauer Zählkammer. Dann erfolgte eine Auswertung, indem man anfangend mit Tag 0 täglich 4 Werte bestimmt und für die Zellzahl in einem ml die Zellzahl-Mittelwerte  $\times 10^4 \times$  Verdünnungsfaktor 20 multipliziert. Es wurde während 5 Tage 4 x täglich gemessen mit einem Biomec spectrofotometer.

25

Die Methode wie die Proliferation der Tumorzellen gemessen wird, ist beschrieben in Lü, H.Q. et al., 1996, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 122, 335-342.

Die Zelllinie wurde behandelt mit (Gly-OH10) - LHRH, das LHRH Hormon (Figur 3), (Sigma Chemical Co., No. L8008) oder TRIPTORELIN, ein LHRH Agonist (Figur 2), (Sigma Chemical Co., No. L9761) oder ANTIDE, ein LHRH Antagonist (Figur 1), (Sigma Chemical Co., No. A8802).

30

Bei den Konzentrationen  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  und mit dem Medium als negativer Kontrolle wurden ab Tag 4 folgende Ergebnisse erhalten:

5 Für ANTIDE (GnRH Antagonisten) ist in Fig. 1 eine deutliche Proliferationshemmung zu sehen in den hohen Konzentrationen  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  von 15% bzw. 35% (ähnlich wie beschrieben von EMONS et al., 1993, supra aber später einsetzend als beim einer der dortigen Ovariumkarzinomzelllinien, wo ab Tag 1 ein antiproliferativer Effekt der Antagonisten bei einer der zwei Zelllinien auftrat). Bei der Konzentration  $10^{-6}$  wurde keine Proliferationshemmung  
10 gesehen, sondern eine Stimulierung des Wachstums von 40%. Dieser paradoxe IN VITRO Effekt von GnRH ANTAGONISTEN ist ähnlich wie bei LIMONTA et al., 1993, J. Clin. Endocrinol. Metab., 76, 839-845 beschrieben für Prostatakarzinom mit GnRH Rezeptoren. Ein ähnlicher in vitro Effekt für relativ niedrige Konzentrationen ist ebenfalls bekannt für Tamoxifen bei der MCF-7 Mammakarzinom Zelllinie (Zänker, K. et al., 1995).

15 Für TRIPTORELIN (GnRH Agonist) (siehe Figur 2) wurde ab Tag 4 eine Proliferationshemmung von 15% festgestellt bei den genannten Konzentrationen. Bei Emons et al., 1993, supra war dies bereits ab Tag 1 für beide Ovariumkarzinomzelllinien bei  $10^{-5}$  M Triptorelin Behandlung zu beobachten und am Tag 6 wurde 40% Hemmung beobachtet.

20 Diese Befunde beweisen das Vorhandensein eines direkten antiproliferativen Effektes von Antide und Triptorelin auf maligne Melanoma. Ebenfalls wird bewiesen, daß GnRH Rezeptoren auf der humanen malignen Melanoma Zelllinie MV 3 vorliegen, da eine Nicht-Ligand Bindung an den Tumorzellen ausgeschlossen ist.

25 Die Kurven der Figuren 1-3 beweisen, daß das maligne Melanoma MV 3 ein LHRH Hormon-abhängiger Tumor ist.

30 Das LHRH-Hormon funktioniert somit in vitro als positiver Wachstumsfaktor. Die Funktion von autokrin-produziertem LHRH-Hormon wird gehemmt von Antide und Triptorelin.

## PATENTANSPRÜCHE

5

1. Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf Tumorzellen ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder Hirnhäuten und/oder vom Kaposi Sarkom, umfassend das Kontaktieren genannter Zellen mit einem Ligand für einen GnRH-Rezeptor, und Bestimmen, ob eine Bindung stattgefunden hat.  
10
2. Eine Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein Antikörper ist.
- 15 3. Methode nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Ligand markiert ist.
4. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der gebundene Ligand bestimmt wird mit markiertem Anti-Ligand, vorzugsweise einem Antikörper.  
20
5. Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten, umfassend:
  - a) Homogenisieren von peroperativ gesammeltem Tumorgewebe,
  - 25 b) Abtrennen der Membranfraktion,
  - c) Bestimmen der Proteinkonzentration in der Membranfraktion von b) und
  - d) Bestimmen der GnRH-Rezeptorkonzentration in der Membranfraktion von b) zur Diagnose der genannten Tumoren.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Gewebe von einem Glioblastoma multiforme, Medulloblastom, Pinealom, Neuroblastom, Craniopharyngeom, Meningeom, Chordom, Ewing-Sarkom, malignes Melanom oder Kaposi-Sarkom stammt.

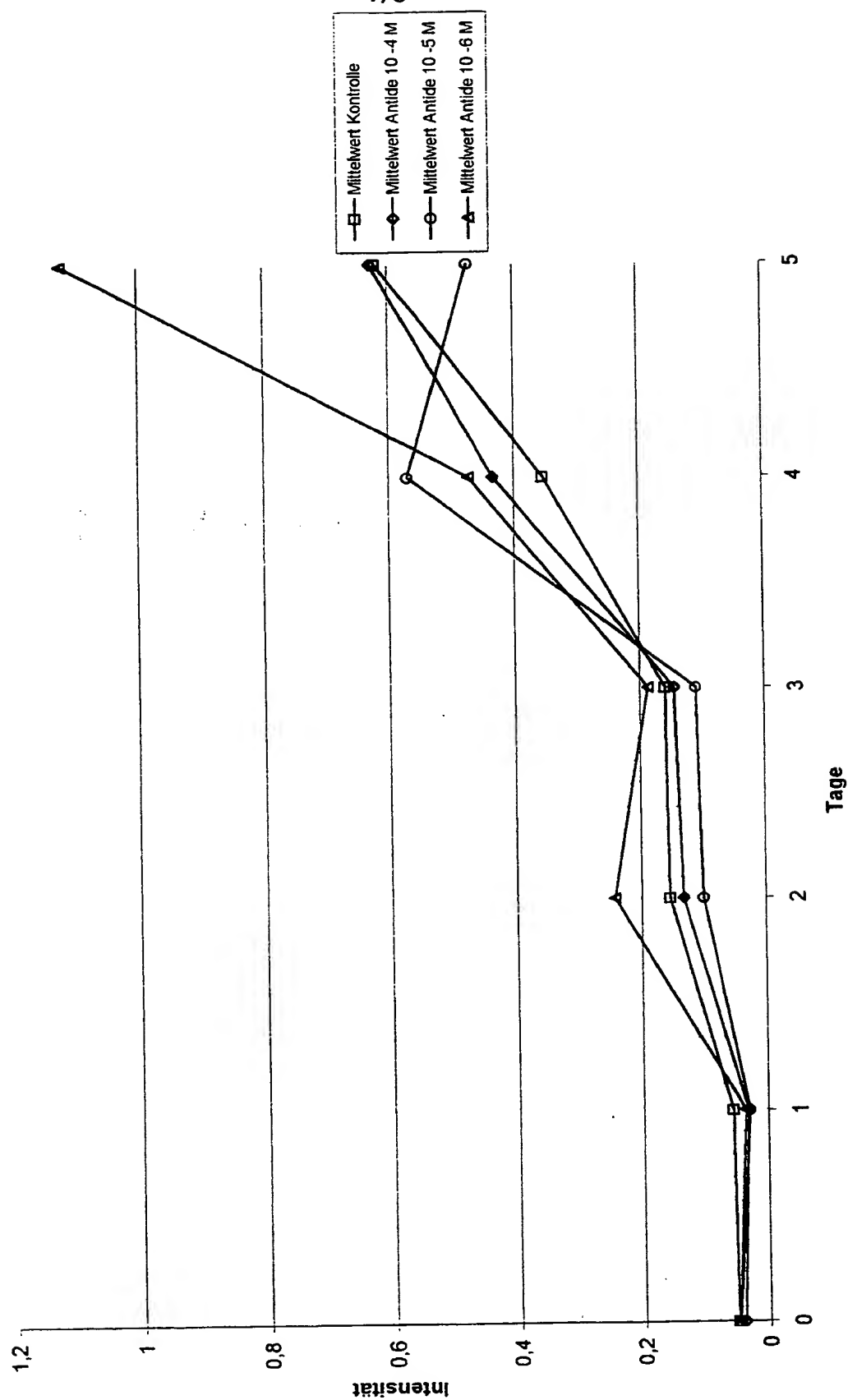
7. Diagnostik-Kit zum Ausführen einer Methode nach Anspruch 1 bis 6, umfassend einen Liganden für einen GnRH-Rezeptor.
- 5 8. Diagnostik-Kit nach Anspruch 7 zum Nachweis von GnRH-Rezeptoren zur immunhistologischen Diagnostik, zur Therapieüberwachung, Nachsorge, zur Rezidivfrüherkennung und zur Früherkennung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten, umfassend entweder einen GnRH-Agonisten oder einen mono-oder polyklonalen Antikörper gegen GnRH-Rezeptoren.
- 10 9. Diagnostik-Kit nach Anspruch 3, umfassend die Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 7 oder 8.
- 15 10. Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder zur Behandlung eines Kaposi-Sarkoms.
- 20 11. Verwendung von GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Glioblastoma multiforme, Medulloblastoms, Pinealoms, Neuroblastoms, Craniopharyngeoms, Meningeoms, Chordoms, Ewing Sarkoms, malignen Melanoms oder Kaposi-Sarkoms.
- 25 12. Ein Konjugat von einem GnRH-Agonisten oder -Antagonisten mit Melatonin oder mit einem Melatonin-Analog.
13. Ein Konjugat von einem GnRH-Agonisten oder GnRH-Antagonisten mit einer zytotoxischen Substanz.

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**



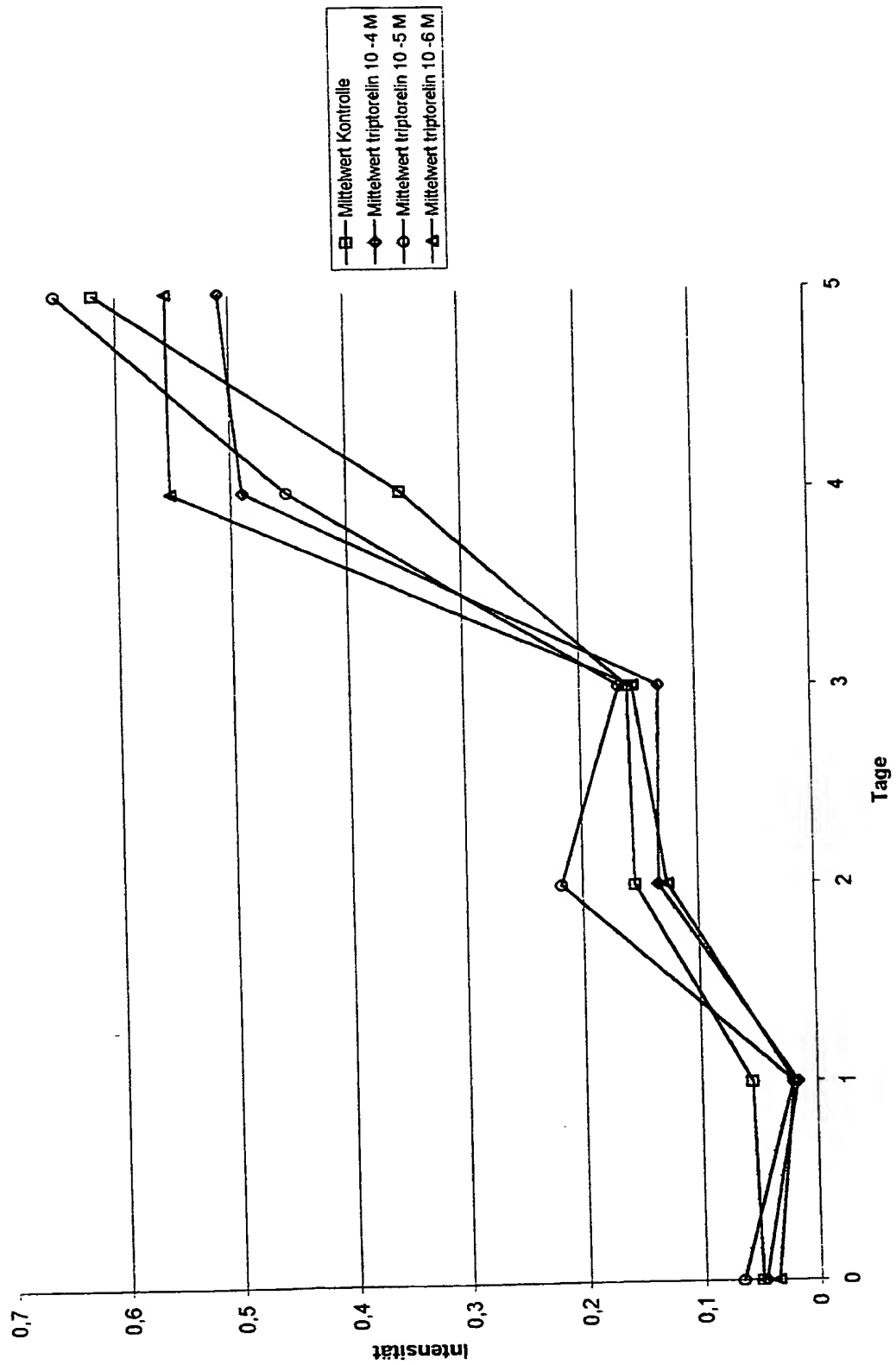
1/3

Figur 1 Antide



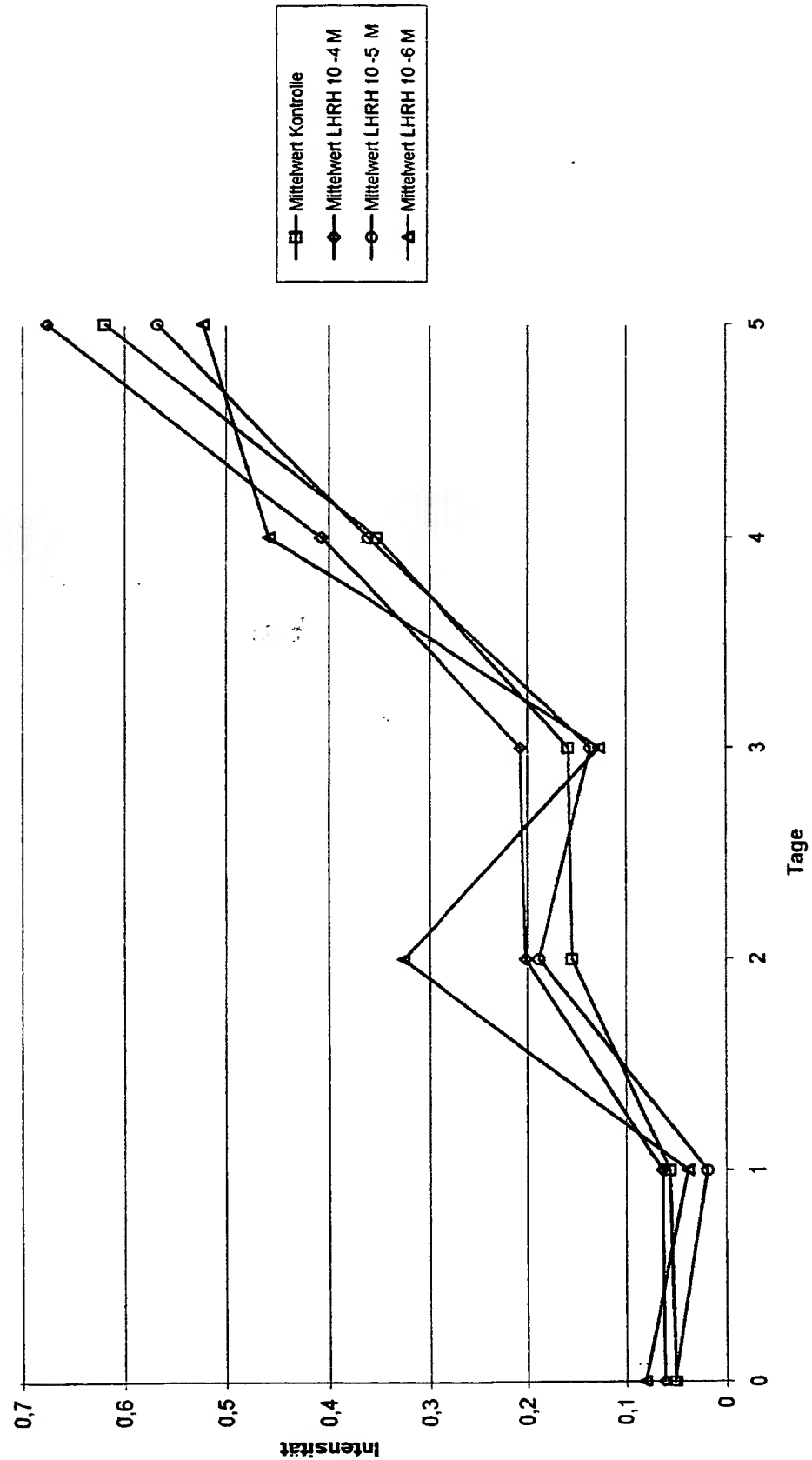
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Figur 2 triptorelin



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Figur 3 LHRH Hormon



**THIS** U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE (5010)

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/574, 33/566, 33/74, A61K</b> <b>38/25, 38/22</b>		<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/01764</b>  <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum:</b> 14. Januar 1999 (14.01.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01902 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. Juli 1998 (03.07.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 28 737.9      4. Juli 1997 (04.07.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> VAN GROENINGHEN, Johannes, Christianus [NL/DE]; Bergweg 35, D-58313 Herdecke (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 14. Mai 1999 (14.05.99)	
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR DETERMINING GnRH RECEPTORS  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON GnRH-REZEPTOREN  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to a method for recognizing and determining GnRH receptors on abnormal cells of a tumour originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or on Kaposi sarcoma. The invention also relates to the preparation of diagnostic kits for tumours originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or for Kaposi sarcoma. The invention further relates to the use of GnRH agonists and GnRH antagonists and/or other ligands for GnRH receptors for producing medicinal drugs for the treatment of tumours originating in the brain and/or nervous system and/or the meninges and/or for the treatment of Kaposi sarcoma.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erkennung und Bestimmung von GnRH-Rezeptoren auf entarteten Zellen eines Tumors ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder auf das Kaposi-Sarkom. Ferner betrifft die Erfindung die Bereitstellung eines Diagnostik-Kits für Tumore ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder den Hirnhäuten und/oder für das Kaposi-Sarkom. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten und/oder anderer Liganden für GnRH-Rezeptoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren ausgehend vom Hirn und/oder Nervensystem und/oder der Hirnhäuten und/oder zur Behandlung von Kaposi-Sarkom.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/01902

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/574 G01N33/566 G01N33/74 A61K38/25 A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia, PA, USA abstract no. PREV199497360906, see abstract XP002090711 & J.M. ALEXANDER ET AL.: "Gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA expression by human pituitary tumors in vitro." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 93, no. 6, 1994, pages 2332-2339, Boston MA USA	1
X	WO 90 09799 A (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 7 September 1990 see claims 1,11 --- -/--	13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 1999

Date of mailing of the international search report

09/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte      Onal Application No  
PCT/DE 98/01902

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 23, 3 June 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 307632, XP002090712 see abstract &amp; S.S. KAKAR ET AL.: "Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor: molecular cloning, tissue distribution and regulation of gene expression in pituitary, brain and tumor." MOLECULAR ANDROLOGY, vol. 8, no. 1, 1996, pages 95-125, Birmingham AL USA</p>	1-13
T	<p>-----</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 129, Columbus, Ohio, US; abstract no. 311053, XP002090713 see abstract &amp; J.C. VAN GROENINGHEN ET AL.: "Effects of luteinizing hormone- releasing hormone on nervous system tumors" LANCET, vol. 352, no. 9125, 1 August 1998, pages 372-373, London UK</p> <p>-----</p>	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/01902

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9009799 A	07-09-1990	AU 5186090 A	26-09-1990
		US 5631229 A	20-05-1997
		US 5492893 A	20-02-1996
		US 5488036 A	30-01-1996
		US 5786457 A	28-07-1998
		US 5707964 A	13-01-1998
		US 5378688 A	03-01-1995
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK (USFIC)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01902

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/574 G01N33/566 G01N33/74 A61K38/25 A61K38/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia, PA, USA abstract no. PREV199497360906, siehe Zusammenfassung XP002090711 & J.M. ALEXANDER ET AL.: "Gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA expression by human pituitary tumors in vitro." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 93, Nr. 6, 1994, Seiten 2332-2339, Boston MA USA	1
X	WO 90 09799 A (COLORADO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 7. September 1990 siehe Ansprüche 1,11 --- -/--	13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 23, 3. Juni 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 307632, XP002090712 siehe Zusammenfassung & S.S. KAKAR ET AL.: "Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor: molecular cloning, tissue distribution and regulation of gene expression in pituitary, brain and tumor." MOLECULAR ANDROLOGY, Bd. 8, Nr. 1, 1996, Seiten 95-125, Birmingham AL USA ----	1-13
T	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 129, Columbus, Ohio, US; abstract no. 311053, XP002090713 siehe Zusammenfassung & J.C. VAN GROENINGHEN ET AL.: "Effects of luteinizing hormone- releasing hormone on nervous system tumors" LANCET, Bd. 352, Nr. 9125, 1. August 1998, Seiten 372-373, London UK -----	1-13

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/01902

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9009799 A	07-09-1990	AU 5186090 A	26-09-1990
		US 5631229 A	20-05-1997
		US 5492893 A	20-02-1996
		US 5488036 A	30-01-1996
		US 5786457 A	28-07-1998
		US 5707964 A	13-01-1998
		US 5378688 A	03-01-1995
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK** (USPTO,